

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 28 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22654067

研究課題名（和文） 核磁気共鳴分光法（NMR）を用いたジオメタボロミクスの開発

研究課題名（英文） Development of NMR application to Geo-metabolomics

研究代表者

力石 嘉人（CHIKARAISHI YOSHITO）

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：50455490

研究成果の概要（和文）：本研究では、堆積物などの環境試料の抽出物に対して、核磁気共鳴分光法（NMR）を用いた有機化合物の一次スクリーニング法の開発を試みた。その結果、淡水性試料に含まれるクロロフィルやアミノ酸などの有機化合物に対しては、1mm プロブを用いた ^1H NMR により、実用レベルでの定量スクリーニング法を確立した。一方で、(1) 海洋性試料に対しては、多量に存在する有機酸と無機塩の妨害により高感度スクリーニングが行えないこと、(2) 他核 NMR (^{13}C , ^{15}N NMR) や ^1H - ^{13}C , ^1H - ^{15}N などの 2 次元 NMR では、実用レベルでの定量スクリーニングが非常に難しいことがわかった。

研究成果の概要（英文）：As a NMR (Nuclear Magnetic Resonance) application to geochemistry, I tried to develop a rapid and simple primary screening method to identify and quantify organic compounds in extracts from geological samples (e.g., soils and sediments). The results show that ^1H -MNR with 1 mm probe can be very much useful for a rapid and simple primary screening (both identification and quantification) of several targeted organic compounds such as chlorophylls and amino acids in the extracts from soils and lacustrine sediments. However, at this moment, it did not work sufficiently for extracts from marine sediments, because high concentration of organic acids and salts in these samples always obstruct spectrum-scan with high resolution. Moreover, other nuclear NMR such as ^{13}C NMR and ^{15}N NMR and two-dimensional NMR such as ^1H - ^{13}C and ^1H - ^{15}N were also not useful as a rapid and simple primary screening method for geological samples due to low sensitivity of the spectrum-scan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	540,000	3,240,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地球宇宙化学

キーワード：生物圏地球化学

1. 研究開始当初の背景

海洋や湖沼の堆積物の解析は、当時の地球環境の復元や、過去～現在における気候変動とその要因の解明に役立ち、地球温暖化が将来の環境に及ぼす影響を正確に予測する上での重要な知見を提供する。また堆積物の中には、地表のバイオマスに匹敵するほどの多種多様な生物が生息し、メタンハイドレートの生産や、生命の起源に結びつくような原始的な生命活動の場になっている。そのため統合国際深海掘削計画 (IODP) をはじめとして、国内外の様々なプロジェクトで、世界中の堆積物、堆積岩が採取され、その解析が積極的に進められている。

しかし、堆積物に含まれる生物の代謝産物やその続成物の解析には、これらを抽出、粗精製して、各種クロマトグラフィや質量分析法を用いて解析するという手法が、広く一般的に用いられてきたが、最も基礎的な一次情報 (目的の化合物の同定と定量) の取得だけでも、非常に多くの時間を要する (一般的に、十数試料の分析で 1~2 週間、時には一ヶ月以上) という欠点がある。そのため、数キロメートルにおよぶ柱状試料を高分解能 (ミリメートルスケール) で解析することは、膨大な時間と労力をかけなければならず、本質的に難しい。このことは、それに関わる研究者の疲弊や研究の停滞に直結する重要な問題となっている。従って、従来法のパフォーマンスの悪さを克服した新規解析手法 (地質試料中の有機化合物の一次情報を、網羅的、定量的、且つ迅速、簡易に非破壊でスクリーニングできる手法) の探索や開発が急務となっている。

一方で、他分野、とくに生化学の分野では、近年、メタボロミクス (Metabolomics) あるいはメタボローム解析 (Metabolomic analysis) といった、生物の代謝活動で増減する有機分子を網羅的に解析する手法が積極的に研究され、生物体内で起こる様々な反応の意味・役割や、それを統合した生物代謝の全体像の理解が飛躍的に進んでいる。その伝統的な手法は、地質試料の解析と同様に、やはり、代謝産物やその続成物を抽出、粗精製して、各種クロマトグラフィや質量分析法により解析を行うというものであったが、近年のこの分野の発展は、核磁気共鳴分光法 (NMR) の普及による成果と言える。NMR 法は、水もしくは有機溶媒による一次抽出液に対して、それ以上の特殊な前処理や精製を行うことなく、抽出液中に含まれる有機化合物の同定・定量を行うことができる。また、分光法であるため、完全非破壊 (分析後に、試料の完全な回収が可能) で、極めて簡易な自動分析により解析を行うことができるという、非常に優れた特徴を持つ。

しかしながら、NMR 法は、クロマトグラフィや質量分析法に比べて、一般的に、検出感度が 3~5 桁、またはそれ以上低く、また、正確にスペクトル解析を行うためには、かなりの経験と知識が必要であるという欠点もある。そのため、これまで地質学試料への応用は、ほとんどなされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、核磁気共鳴分光法 (NMR) を用いて、堆積物や土壌などの地質学試料に保存されている多種多様な有機化合物を、網羅的、定量的、かつ迅速、簡易に非破壊でスクリーニングする「ジオメタボロミクス」と定義できるような全く新しい研究手法を開発することである。その達成は、堆積物、堆積岩等に含まれる有機化合物の一次情報 (どのような化合物がどのくらい存在するのか) とその深度分布の詳細を、誰もが簡単に、高分解能で描き出せるようになることを意味する。非破壊で一次スクリーニングが行えることは、スクリーニング後の試料を、安定同位体比分析などのより高次な化学分析にそのまま利用できる点において重要である。

しかしながら、これまでに国内外で、このような手法が研究された例は皆無であり、またその可能性に気付いている研究者もほとんどいないと思われる。本研究の全てが、当初の予想通り、もしくは、それ以上の成果をあげた場合、今後 NMR を用いたジオメタボロミクスは、地質学試料を用いた研究の必須ツールになることは明白であり、過去の地球環境の復元や気候変動の解析だけでなく、将来の気候変動を予測する研究や地下生命圏の研究などにも新しい展開をもたらすことが期待できる。実際には、当初の予想通り、もしくはそれ以上の成果をあげるとは、思えないが、それでも本研究で得られた知見は、将来の萌芽研究に繋がる最初の結果として非常に重要であると考えられる。

3. 研究の方法

ガスクロマトグラフィや高速液体クロマトグラフィを用いた質量分析法 (MS) は、一般的に、検出感度が高く、試料に含まれるピコ (10⁻¹²) モルオーダーの有機化合物の同定・定量が可能であるという反面、測定までの前処理 (抽出・粗精製) に非常に時間がかかるという欠点を持つ。一方で NMR 法は、煩雑な前処理操作なしに、試料またはその一次抽出液 (水抽出液、もしくは有機溶媒抽出液) に含まれる全ての有機化合物の構造と量を、非破壊で一度に短時間 (数分) で測定できる。しかし、MS に比べて感度が著しく低く、最も感度の高い水素 (¹H) NMR でも、

マイクロ (10⁻⁶) モルオーダーの試料が必要である。この「感度が著しく低い」という欠点は、地質学試料への測定がこれまでに行われてこなかった主因の1つである。そこで本研究では、以下の4つのアイデアで、NMRの欠点の克服を試みた。

(1) ターゲットを決める

土壌・堆積物といった地質学的試料中には、無数の有機化合物が含まれているので、全有機化合物の網羅的解析は、ほとんど不可能である。そこで、本研究では、2つの有機化合物群：クロロフィル類 (図 1a) とその続成物 (各光合成生物の生産量等を反映する代表的な指標化合物) とアミノ酸類 (図 1b, 全ての生物が持ち、多くの代謝に関係する基本的な有機化合物) を、ターゲットとして研究を進めた。両化合物とも、窒素を含む含窒素有機化合物であり、脂肪酸などの他の脂質化合物に比べて特徴的な NMR スペクトルを示す。

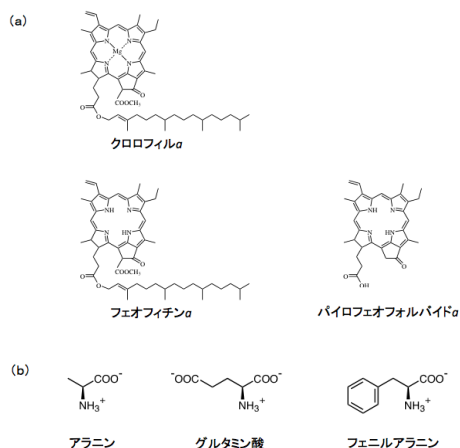


図1 (a) 代表的なクロロフィル(クロロフィルa)とその続成物(フェオフィチンa, バイロフェオフォルバイドa), (b) 代表的なアミノ酸(アラニン, グルタミン酸, フェニルアラニン)

(2) 1 mm プローブの利用

通常のNMRでは、直径5mmのプローブが用いられるが、地質試料への分析に必須の感度向上を行うために、近年極低濃度試料の解析用に開発された、微小サンプルチューブ(1mmプローブ)を導入した。1mmプローブを用いることで、約100倍の感度向上が期待できる。

(3) 2次元NMRの活用

NMR分析では、水素は最も相対存在量が高い同位体核種 (¹H: 99.98%) を対象にするので検出感度が高い。しかし、炭素・窒素に関しては、相対存在量が低い同位体核種 (¹³C: 1.1%, ¹⁵N: 0.37%) を対象にするので、非常に感度が低い。そこで、本研究では、1mmプローブを用いて、2次元NMR (¹H-¹³C, ¹H-¹⁵N) による検出感度の向上を試みた。

(4) 同位体ラベル修飾の利用

(3)と同様の理由により、¹³C NMR, ¹⁵N NMRの感度は、非常に低い。そこで、本研究では、試料に含まれるターゲット化合物に対して、人工的に¹³Cや¹⁵Nで99.9%ラベル化された官能基を化学修飾することで検出感度の向上を試みた。理論的には、炭素で(99.9÷1.1)=90倍、窒素で(99.9÷0.37)=270倍の感度向上が期待できる

4. 研究成果

(1) 成功事項

最大の研究成果として、¹H NMRを導入し、測定条件(使用する溶媒)の最適化、核スピンの励起・スペクトルの検出に関わる様々なパラメーターの最適化、内部標準物質の検討を行い、クロロフィルやアミノ酸の標準品に加え、陸上植物・淡水性培養藻類、土壌、湖沼堆積物のアセトン抽出物に含まれるクロロフィルとその続成物(フェオフィチンなど)について、また、これらの試料の塩酸(HCl)加水分解液に含まれるアミノ酸について、従来法の約500分の1の高感度(での定量分析が可能になった)。

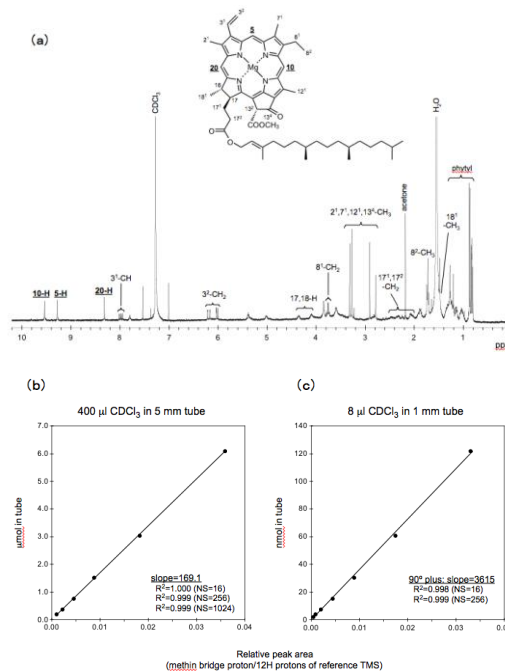


図2 (a) クロロフィルの¹H NMRスペクトル, (b) 5mmプローブでの定量検量線, (c) 1mmプローブでの定量検量線

例えば、クロロフィルは、窒素を含む芳香族ポルフィリン骨格に直に結合している3つの水素(5-H, 10-H, 20-H, 図2aを参照)が、脂肪酸、ステロール、テルペノイドなどの他の主要天然有機化合物にはほとんど見られないような、8-10ppmあたりに特徴的なシフトを示す(図2a)。これらの検出限界は、通常の5mmプローブを用いると、0.5µmol/tube程度であるが(図2b)、本研究

で行った 1mm プローブを用いた測定では、1nmol/tube 程度となり、従来法の 500 分の 1 の高感度での定量分析が行えることがわかった。試料に対して行った前処理は、アセトンでの超音波抽出 (0°C, 15 分×3 回)、溶媒の濃縮、1mm プローブ容器への移し替えのみであり、¹H NMR スペクトルの測定は、全自動分析 (測定器のチューニング等も含めて、一試料あたり約 5 分) であるので、従来のガスクロマトグラフィや高速液体クロマトグラフィを用いた質量分析法 (MS) に比べて、明らかに迅速・簡易に、且つ高分解能での分析に実用可能な結果である。1nmol という ¹H NMR の測定に必要な試料量は、まだまだ満足できる検出限界とは言えない。しかし、生物試料に関しては全く問題ないレベルであり、また土壌・堆積物試料に関しても、ある程度実用可能なレベルである。これらの結果は、現在論文を準備中である。

(2) 1 mm プローブ導入 - 問題点

上記(1)の事項の他に、本研究では以下の 2 つの大きな問題点も明らかになった (これらは、今後の研究課題である)。そのため、現時点では、研究開始当初に比較的楽観的に期待していた「NMR を用いたジオメタボロミクス」は、残念ながら、標準物質、生物、土壌、淡水性堆積物 (湖沼など) に対する ¹H NMR に限定されることがわかった。以下に問題点と本研究で実施した対処法等を記述する。

① 海洋性の堆積物への適用

上記(1)で用いた方法で、海洋性の堆積物の抽出物へ適応すると、著しく解像度の悪いスペクトルが得られた。そこで、本研究ではこれらの低解像度の原因となる妨害有機物の同定、液-液抽出やマイクロ固相抽出などによる妨害有機物の除去といった前処理法の検討を行った。

その結果、試料に含まれる比較的低分子の有機酸と、海性の試料に特有な塩分 (特に Na⁺, Ca²⁺などの陽イオン) の双方が、複合的に組み合わさり、NMR 測定における低解像度の原因になっていることを突き止めた。具体的には、フェオフィチン (クロロフィルの脱 Mg 化体、HCl を添加すると、クロロフィルの脱 Mg 化が起こるため、本研究ではあらかじめフェオフィチンを使用した)、アミノ酸などの標品に対して、(1) HCl, 低分子有機酸 (酢酸、プロピオン酸など) を単独で添加しても、NMR スペクトルの解像度には影響を及ぼさない、(2) Na⁺, Ca²⁺などの陽イオンを、同標品に添加すると NMR スペクトルの解像度が減少する (S/N 比で 120~270 分の一になる)、(3) 低分子有機酸と Na⁺, Ca²⁺などの陽イオンを同標品に添加すると NMR ス

ペクトルの解像度が著しく減少する (S/N 比で 1830~10350 分の一になる)、という結果が得られた。

このように、海洋性の堆積物へ本法を適用するには、海性試料に特有な塩分を除去することが、必須であることがわかった。そこで、本研究では、その除去法として、フェオフィチンに関しては水/アセトン-ヘキサンを用いた液-液抽出、アミノ酸に関してはイオン交換カラムによる精製を検討した。その結果、まず、液-液抽出を数回繰り返しても、試料に含まれる塩分を完全に除去することが難しい、ということがわかったが、それでも、フェオフィチンのような疎水性の有機化合物に対しては、塩の影響をかなり削減することができた。内部標準法を用い、且つ、NMR の測定条件の最適化することで、非海性試料における ¹H NMR 対して約 1/3~1/8 の S/N で、スペクトルが得られることがわかった。一方で、イオン交換カラムによる処理を行えば、アミノ酸に関しては、非海性試料における ¹H NMR とほぼ同様の感度で測定ができることがわかった。しかしながら、これらの前処理の実施、とくにイオン交換カラムによる精製は、NMR 法の「前処理不要・迅速・簡易」というアドバンテージを打ち消してしまうので、別の塩除去法の検討や、イオン交換カラム自体の簡易化・迅速化が、今後の課題として残った。

② ¹H NMR を主軸とした、¹H-¹³C および ¹H-¹⁵N の二次元 NMR の可能性

一般的に NMR 分析では、水素は最も相対存在量が高い同位体核種 (¹H : 99.98%) を対象にするので検出感度が高い。一方で、炭素・窒素に関しては、相対存在量が低い同位体核種 (自然存在度、¹³C : 1.1%, ¹⁵N : 0.37%) を対象にするので、その感度は著しく低い。さらに 1mm プローブは、装置の特性上、水素 (¹H) 専用といえるものであり、炭素・窒素に関する測定は、例えば、¹³C で完全にラベル化された標品を用いても、数十~数百マイクロモル (μmol) 以上の有機化合物を数マイクロリッター (μL) の溶媒に溶かさねばならず、現実的にはほとんど不可能である。そこで本研究では、1mm プローブを用いて、¹H-¹³C および ¹H-¹⁵N の二次元 NMR による炭素・窒素のスペクトル解析が可能かどうか検証した。これは、¹H NMR の高感度を利用して、炭素・窒素と水素のカップリングを検出し、炭素・窒素の情報を間接的に取得する方法である。一方で、二次元 NMR は測定に時間が掛かる (一定時間当たりのスペクトル測定回数が少ない) ため、得られるスペクトルの解像度 (S/N 比) が低くなるという欠点もある。

二次元 NMR 法におけるこれらの検証の結

果は、当初の予想通り、 ^1H - ^{13}C 二次元 NMR により、1mm プローブを使って、数十マイクロモルの非ラベル化有機化合物の炭素のシグナルを捉えることができた。しかし、この感度では、当初の目標値（実用可能なレベル）に比べてまだ 4~6 桁以上悪い。また、 ^1H - ^{15}N 二次元 NMR に関しては、99.9%の ^{15}N ラベル化試料においてでさえ、窒素のシグナルが僅かに捉えられただけであった。これは、非ラベル化有機化合物に対しては、数十ミリグラムの試料を数マイクロリッター (μL) の溶媒に溶かさなければ、測定出来ないことを意味する。

現時点では、二次元 NMR の様々な条件設定（濃度、用いる溶媒、pH 等、核スピンの励起方法、NMR 測定における各種パラメーター）の最適化が、まだまだ不十分であるので、その点に関しては再検討の余地がある。しかしながら本研究の結果は、「 ^1H NMR を主軸とした、 ^1H - ^{13}C および ^1H - ^{15}N の二次元 NMR のジオメタボロミクスへの応用の可能性は低い」というものであった。

③ 同位体ラベル修飾の利用

^{13}C NMR, ^{15}N NMR の低感度を克服するため、本研究では、試料に含まれるターゲット化合物に対して、人工的に ^{13}C や ^{15}N で 99.9% ラベル化された官能基を化学修飾することで検出感度の向上を試みた。理論的には、最大で炭素で $(99.9 \div 1.1)^2 = 8000$ 倍、窒素で $(99.9 \div 0.37)^2 = 73000$ 倍の感度向上が期待できる（ただし、実際には、ラベル化剤の ^{13}C または ^{15}N 濃度が 99.9% ということは無く、励起エネルギーがラベル化された誘導體機のみではなく、化合物全体に働く。また修飾効率も 100% ではないため、理論通りにはならないと考えられる）。

具体的には、(1) 試料中のカルボン酸に対して、 ^{13}C ラベル化メタノールを用いたエステル化、(2) 試料中のアルコール酸に対して、 ^{13}C ラベル化酢酸を用いたアセチル化を検討した（窒素に関する検討は行っていない）。

その結果、 ^{13}C ラベル化された官能基で試料を修飾すると、最大で約 2000 倍（標品）または約 200 倍（堆積物試料）の感度向上が得られること、しかしながら、その感度は、(1) ラベル化率、(2) 分析対象の有機物の構造、(3) 夾雑物の存在（様々な有機化合物との混合比）、に依存することがわかった。

このように、同位体ラベル修飾の利用は、試料に含まれる有機化合物の官能基のスクリーニング分析に、まだまだ限定的ではあるが、有用であることがわかった。但し、感度が有機化合物の構造や混合比に依存するという事は、定量が難しくなるということも意味するので、定量性の確保や複雑なシグナルから、どのように解析を行うのか（具体的

には、官能基の総存在量分析からどのように各有機化合物の存在量の情報を得るのか）が、今後の重大な課題として残った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

力石 嘉人

(CHIKARAISHI YOSHITO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・
極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：50455490